

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 4 月 21 日 (21.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/035573 A1

(51) 国際特許分類: C07K 16/00, 1/02, C12N 15/09  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/014919  
(22) 国際出願日: 2004 年 10 月 8 日 (08.10.2004)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願2003-351410 2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 早坂 昭 (HAYASAKA, Akira) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 井川 智之 (IGAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 関森 泰男 (SEKIMORI, Yasuo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF STABILIZING PROTEION SOLUTIONS

(54) 発明の名称: タンパク質溶液の安定化方法

(57) Abstract: In the pH region and salt concentration suitable for the preservation of IgM, citrate buffers have been examined for the effect of protecting IgM from low-temperature precipitation. As a result of the examination, it has been found that citrate buffers remarkably inhibit the low-temperature precipitation.

(57) 要約: IgM の保存に適した pH 領域および塩濃度において、IgM の低温沈殿を抑制する方法として、クエン酸緩衝液を検討した結果、クエン酸緩衝液が低温沈殿を顕著に抑制することを見出した。



WO 2005/035573 A1

## 明 細 書

### タンパク質溶液の安定化方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質を低温で安定化する方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 多くの高等動物の免疫グロブリンには、5種類の異なったクラスIgG、IgA、IgM、IgD、およびIgEが存在する。各クラスの免疫グロブリンは、大きさ、電荷、アミノ酸組成、糖含量等の性状が異なっている。これらのクラスの中で、IgMは血漿免疫グロブリン全体の約10%を占めている。IgMは、複雑な抗原性を持つ細胞膜抗原、感染性微生物、あるいは溶解性抗原に対して産生される初期抗体の主成分である。

[0003] ヒトIgMは、通常、5量体構造を有している。IgMの5量体構造を構成する5つのサブユニットは、IgGに類似した4本鎖構造からなっている。IgMのH鎖である $\mu$ 鎖はIgGのH鎖である $\gamma$ 鎖とアミノ酸配列が異なる以外にも次のような相違を有する。

$\mu$ 鎖は、定常領域のドメインを、 $\gamma$ 鎖よりも一つ余分に持っている。

$\mu$ 鎖は、オリゴ糖鎖の数が $\gamma$ 鎖と比較して4箇所多い。

IgMは、IgGには見られないJ鎖と呼ばれるポリペプチド鎖を有する。J鎖は、IgMが抗体産生細胞から分泌される前に、 $\mu$ 鎖の会合を補助すると考えられている。

[0004] 近年、モノクローナル抗体技術および組換えDNA技術の発展により、純粋な免疫グロブリンを大量に生産することが可能になった。更に遺伝子組み換え技術は、キメラ抗体やヒト化抗体生産を可能にした。キメラ抗体とは、可変領域を異なる種に由来する可変領域に組み換えた構造を有する抗体である。たとえば、ヒト以外の動物種の可変領域とヒト抗体の定常領域を有する「キメラ抗体」(非特許文献1／Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, (1984)81:6851)が公知である。更に、他の動物種の相補性決定領域(complementarity determining regions;CDR)をヒト免疫グロブリンに移植したヒト化抗体も公知である(非特許文献2／Nature (1986)321:521)。

[0005] 実際に、抗腫瘍抗体に関して列挙すると、抗CD20ヒトキメラ抗体であるリツキシサン(Rituxan:IDEC社)や抗HER2/neuヒト化抗体であるハーセプチン

(Herceptin:Genentech社)が臨床試験を終了し、既に承認・販売されている。IgGおよびIgMのエフェクター機能として抗体依存性細胞障害活性(以下、ADCC活性と表記する)や補体依存性細胞障害活性(以下、CDC活性と表記する)が知られている。IgMのCDC活性はIgGと比較して高いことから、CDC活性を主薬効とする抗腫瘍抗体となる可能性が極めて高いと思われる。しかし上述のとおり、IgMはIgGと異なり多量体を形成する。そのため、組換え体IgMを工業的規模で生産することは困難であると考えられていた。

[0006] また、IgMは、IgGに比べて極めて不安定であり、また溶解度が低いことから、IgMの高濃度且つ安定な溶液を作製することは困難である。例えば、Cytotherapy, 2001, 3(3), 233-242(非特許文献5)は、IgMの-20℃保存においても溶解時にIgMの沈殿および活性低下が起こったことを報告している。また、同文献には、IgMは保存時に会合化および沈殿を起こしやすいことが記載されている。また、Arch. Pathol. Lab. Med., 1999, 123, 119-125(非特許文献6)には、ヒト血清で観察されるcryoprecipitationあるいは低温沈殿と呼称される沈殿のうち、単一の抗体成分からなる沈殿を生じるType I cryoglobulinは、おもにIgMであることが示されており、特にIgMは、低温沈殿が起こりやすく、低温において高濃度溶液を得ることが困難である。バイオ医薬品のほとんどは安定性を確保するために、4℃付近で冷蔵保存・冷蔵流通する。IgMには、4℃等で低温沈殿するものがあることから、製剤化にあたっては、保存および流通過程において、この低温沈殿を抑制することが望ましい。また、製剤化に至るIgM原薬製造工程においても、低温での精製・濃縮処理や複数の工程間での低温保存の際に低温沈殿が生じて、工程操作に支障をきたす問題もあり、低温沈殿を抑制することが望ましい。

[0007] そこで、低温において、IgMを安定化させる種々の試みがなされている。例えば、Immunochemistry, 1978, 15, 171-187(非特許文献3)においては、IgMの低温沈殿は、低温、高濃度ほど生じやすく、また、pH5〜pH10の範囲内で低温沈殿が起こることが開示されている。そして、この低温沈殿は、極端に高いpHあるいは低いpHにおいて回避することが可能であることも開示されている。しかしながら、一般的に抗体は高いpHでは脱アミド反応や会合化、低いpHでは変性や会合化が起こり易く、pH5〜

pH8 さらにはpH5〜pH7付近で化学的・物理的に安定であることが知られている。そのため極端に高いpHあるいは低いpHは、医薬品としての使用に耐えうる安定性を確保するのは困難である。

[0008] また、Journal of Biological Chemistry, 1997, 252(22), 8002-8006 (非特許文献4)においては、様々な化合物の低温沈殿(低温におけるIgMの溶解度)へ及ぼす影響を検討し、糖類を添加することや、塩濃度をあげると低温沈殿が減少することが開示されている。しかし、開示されている文献では、いずれの糖類、塩類の場合でも低温沈殿の効果的な回避には、およそ500mM以上の高濃度糖類、塩類の添加が必要であることが示されており、医薬品としての使用に際しては、さらに低い濃度で効果があるものが望ましい。

[0009] また、WO 91/18106 (特許文献1)においては、IgMに結合している糖鎖構造を変えることによって、低温沈殿を防ぐ方法が開示されている。しかしながら、抗体の糖鎖を改変した場合は、抗体の結合活性が変化する場合があります、糖鎖を含む抗体の構造を改変することなく、低温沈殿を抑制する方法の開発が望まれていた。

[0010] 特許文献1: WO 91/18106

非特許文献1: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1984)81:6851

非特許文献2: Nature (1986)321:521

非特許文献3: Immunochemistry, 1978, 15, 171-187

非特許文献4: Journal of Biological Chemistry, 1997, 252(22), 8002-8006

非特許文献5: Cytotherapy, 2001, 3(3), 233-242

非特許文献6: Arch. Pathol. Lab. Med., 1999, 123, 119-125

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、低温にて溶液中のタンパク質を安定化させることにある。特に本発明は、医薬品としての使用に耐えうる条件(例えば、pH、塩濃度など)でタンパク質を安定化させることを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者は、上記課題を解決すべく、IgMの保存に適したpH領域および塩濃度に

において、IgMの低温沈殿を抑制する方法として、一般的に抗体が安定であると考えられているpH5〜8の範囲で、pH緩衝剤の1つとして、クエン酸緩衝液の利用につき検討した。その結果、クエン酸緩衝液が低温沈殿を顕著に抑制することを見出した。即ち、クエン酸緩衝液を用いることで、IgMの低温での溶解度を向上させ、IgMの高濃度溶液を調製することが可能となった。このIgMに対するクエン酸の効果は、イオンの相互作用、ファンデルワールス相互作用、水素結合に代表されるタンパク質間の相互作用の強さを調節することを原理とするものであるため、低温で水溶液に対する溶解度が低下するIgM以外の種々のタンパク質に適用しうるものと考えられる。

[0013] 即ち、本発明は、タンパク質を低温で安定化する方法に関し、より詳しくは、下記発明を提供するものである。

- (1) タンパク質を低温で安定化する方法であって、タンパク質を含有する溶液にクエン酸緩衝液を添加する方法。
- (2) タンパク質の安定化が低温沈殿の抑制によるものである、(1)に記載の方法。
- (3) タンパク質がIgMである、(1)に記載の方法。
- (4) タンパク質を含有する溶液のpHが5〜8である、(1)に記載の方法。

#### 図面の簡単な説明

[0014] [図1]種々の濃度のIgMの低温(4℃)における安定性に対するクエン酸緩衝液の影響を示す写真である。

[図2]10mg/mL IgMの低温(1,4,7℃)における安定性に対するクエン酸緩衝液の影響を示す図である。

[図3]10mg/mL IgMの低温(4℃)における安定性に対するクエン酸緩衝液の影響を示す写真である。

[図4]10mg/mL IgMの低温(4℃)における安定性に対するクエン酸緩衝液の影響を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0015] 本発明において「タンパク質」とは、アミノ酸同士がペプチド結合により結合した化合物を意味する。本発明に適用しうるタンパク質としては、低温で水溶液に対する溶解性が低下するものであれば良く、IgG、ピーナッツアグルチニン(PNA)などが挙げら

れる。

[0016] 本発明におけるタンパク質としては、IgMが特に好ましい。本発明において「IgM」とはH鎖の定常領域として $\mu$ 鎖の定常領域を有し、かつ5量体または6量体の構造を持つイムノグロブリンを言う。一方、本発明におけるIgMを構成する可変領域の由来は限定されない。したがって、 $\mu$ 鎖由来の可変領域に加えて、IgG由来の可変領域やその部分構造を含むことができる。可変領域の部分構造としては、フレームワークやCDRを示すことができる。なお本発明におけるIgMは、形質転換細胞に導入された外来性のIgM遺伝子の発現産物を言う。

[0017] さらに、本発明のIgMを構成する定常領域が由来する動物種も限定されない。つまり本発明のIgMは、IgMタイプのイムノグロブリンを有するあらゆる動物種に由来するIgM定常領域を含む。IgMを体内への投与に用いる場合には、少なくともその定常領域は、投与対象となる種と同じ種に由来することが望ましい。したがって、ヒトへの投与を目的とする場合には、少なくとも定常領域がヒト由来であることが望ましい。ヒト由来の定常領域と、他の動物種、あるいはヒト由来であるが他の個体に由来する可変領域とで構成されるIgMは、キメラ抗体と呼ばれる。定常領域に加えて、可変領域のフレームワークもヒト由来としたIgMは、ヒトへの投与用のIgMとして更に好ましいIgMである。可変領域のフレームワークの構造を維持し、CDRのみを他の動物種の抗体と組み換えられた抗体は、ヒト化抗体と呼ばれている。

[0018] 本発明によれば、高濃度のタンパク質の低温沈殿を抑制することができる。ここで「高濃度」とは、溶液中の含有量が1mg/mLより高濃度（例えば、5mg/mL以上、10mg/mL以上、20mg/mL以上、25mg/mL以上）を意味する。

本発明において使用できる「クエン酸緩衝液」は、クエン酸のみをpH緩衝剤として使用したものに限らず、リン酸などのクエン酸以外のpH緩衝剤も含むものでも良い。

溶液に添加されるクエン酸緩衝液の濃度は、通常、1〜500mMであり、好ましくは5〜100mMであり、さらに好ましくは10〜50mMである。本発明における「安定化」とは、溶液中に生じるタンパク質の低温沈殿の増加を抑制することをいう。

[0019] タンパク質溶液の安定化は、例えば、つぎの式により求まる低温沈殿増加抑制率により測定することができる。

低温沈殿増加抑制率 $= (A-B)/A \times 100$

A:クエン酸緩衝液を添加しないIgM高濃度溶液(コントロール)の低温沈殿の形成率

B:クエン酸緩衝液を添加したIgM高濃度溶液(被験試料)の低温沈殿の形成率

[0020] 本発明の溶液は、タンパク質を含有する溶液にクエン酸緩衝液を添加してから1℃、1週間後の低温沈殿増加抑制率が、好ましくは10%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは50%以上、更に好ましくは80%以上のものである。

本発明のタンパク質を含有する溶液のpHは、タンパク質が安定なpHとすることが可能であり、具体的にはpH5〜8であることが好ましい。また、本発明のタンパク質を含有する溶液のpHは、タンパク質の保存安定性に適したpHとすることも可能であり、具体的にはpH5〜7であることが好ましく、さらに好ましくは、pH5〜6であることが望ましい。

[0021] 本発明の医薬品製剤の剤形に特に限定はなく、任意の剤形とすることが可能である。剤形としては、例えば、溶液製剤、凍結乾燥製剤を挙げることができる。また、溶液製剤としては、冷所保存製剤、常温保存製剤、凍結製剤などが挙げられる。また、本発明の医薬品製剤の投与ルートにも限定はなく、任意の投与ルートを用いることが可能である。したがって、医薬品製剤の使用目的に応じて、経口、非経口投与のいずれでもありうる。

非経口投与のための具体的な剤型として、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などを示すことができる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。

[0022] 本発明の方法により、安定化したIgMは、それ自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した薬剤として投与することもできる。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で使用できる。また、例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、ベヒクル、防腐剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量

は、指示された範囲の適当な容量が得られるように調節することができる。

[0023] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液などが利用される。補助剤には、具体的には、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等を利用することができる。医薬組成物には、適当な溶解補助剤を加えることもできる。例えばアルコールや非イオン性界面活性剤は、溶解補助剤として好ましい。アルコールとしては、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を示すことができる。また非イオン性界面活性剤としては、例えばポリソルベート80、あるいはHCO-50を用いることができる。また、塩化ベンザルコニウム等の陽イオン性界面活性剤も使用できる。

[0024] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なバイアルあるいはアンプルに充填される。

[0025] 医薬品製剤は、対象疾患、患者の年齢、症状により適宜投与量を選択することができる。例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001〜100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の医薬品製剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

その他、本発明の溶液製剤等の調製に関しては、WO2002/096457を、参照のこと。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0026] 以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。



## [実施例1]

以下の実施例では、IgMとして、参考例で作製した組換え型抗ガングリオシドGM3ヒト抗体(以下、「MABON-01」という)を使用した。高濃度MABON-01溶液を室温で作製した。溶液の組成は次の通りである。

クエン酸緩衝液：20mM sodium citrate, 300mM NaCl, pH5.5 (クエン酸緩衝液)

酢酸緩衝液：20mM sodium acetate, 300mM NaCl, pH5.5 (酢酸緩衝液)

また、IgMを含有するクエン酸緩衝液 および酢酸緩衝液を、IgMの濃度に応じて、便宜上、表1のように命名した。

[0027] [表1]

<b>MABON-01</b>	酢酸緩衝液	クエン酸緩衝液
<b>50 mg/ml</b>	<b>A5</b>	<b>C5</b>
<b>33 mg/ml</b>	<b>A4</b>	<b>C4</b>
<b>25 mg/ml</b>	<b>A3</b>	<b>C3</b>
<b>17 mg/ml</b>	<b>A2</b>	<b>C2</b>
<b>8 mg/ml</b>	<b>A1</b>	<b>C1</b>

[0028] これらの溶液を4℃で保存したときの、溶液の様子を図1に示す。A4及びA5の高濃度のMABON-01の酢酸緩衝液溶液で明らかな低温沈殿(cryoprecipitation)が見られたのに対して、同濃度のクエン酸緩衝液溶液(C4及びC5)においては、低温沈殿が見られなかった。すなわち、緩衝液として、クエン酸を用いることで、低温沈殿することなく高濃度化できることが分かった。

## [0029] [実施例2]

約20mg/mLのMABON-01の20mM sodium acetate, 300mM NaCl, pH6.0溶液を室温で調製し、透析膜EasySep (TOMY)を用いて20mM sodium citrate, 300mM NaCl, pH5.5 (クエン酸緩衝液)、または20mM sodium acetate, 300mM NaCl, pH6.0 (酢酸緩衝液)に対して4℃で透析し、緩衝液置換を行った。室温に戻した後、それぞれのbufferで希釈し10mg/mL溶液を調製した。これらの溶液を、0.5mLのPCRチューブに充填し、7℃、4℃、1℃で26日間保存して低温沈殿の生成を目視により確認した。遠心分離を行い得られた上清中のMABON-01濃度をゲルろ過クロマトグラフィーにより測定した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWxl (TOSOH)を用い、

50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH 7.4の溶液を移動相として行った。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体ピーク面積の合計値を低温沈殿前後で比較し、MABON-01の低温沈殿の形成率を算出した。

[0030] 目視では、MABON-01の酢酸緩衝液溶液を4℃、および1℃で保存した場合に低温沈殿が観察されたが、それ以外の溶液では沈殿は認められなかった。

図2に、各試料における低温沈殿の形成率を示した。いずれの緩衝液系においても温度が低い程、沈殿量が増加する傾向が認められたが、どの温度においてもクエン酸緩衝液系では酢酸緩衝液系に比べて沈殿量が少なく、クエン酸緩衝液を用いることによる明らかな低温沈殿抑制効果が認められた。20mMの酢酸緩衝液から20mMのクエン酸緩衝液に変更することにより、高濃度の塩などを加えることなく、より低温での保存が可能であることが確認された。

[0031] [実施例3]

約20mg/mLのMABON-01の20mM sodium acetate, 300mM NaCl, pH6.0溶液を室温で調製し、透析膜EasySep (TOMY)を用いて20mM sodium citrate, 300mM NaCl, pH5.0, pH5.5, または pH6.0 (クエン酸緩衝液)、および20mM sodium acetate, 300mM NaCl, pH5.0, pH5.5, または pH6.0 (酢酸緩衝液)に対して4℃で透析し、緩衝液置換を行った。室温に戻した後、それぞれのbufferで希釈し10mg/mL溶液を調製した。これらの溶液を、0.5mLのPCRチューブに充填し、4℃で29日間保存して低温沈殿の生成を目視により確認した。遠心分離を行い得られた上清中のMABON-01濃度をゲルろ過クロマトグラフィーにより測定した。ゲルろ過クロマトグラフィーはカラムとして、G4000SWxl (TOSOH)を用い、50 mM sodium phosphate, 500 mM KCl, pH 7.4の溶液を移動相として行った。ゲルろ過クロマトグラフィーの会合体ピーク面積と単量体ピーク面積の合計値を低温沈殿前後で比較し、MABON-01の低温沈殿の形成率を算出した。

[0032] 目視による溶液の様子を図3に示す。酢酸緩衝液のpH5.5、pH6.0で低温沈殿が観察されたが、それ以外の溶液では沈殿は認められなかった。

低温沈殿の形成率を図4に示す。酢酸緩衝液系ではpH5.5で最大となるカーブを示したのに対し、クエン酸緩衝液系では沈殿量が少なく、一定の傾向は観察されな

かった。製剤に最適なpH5.5〜6.0の範囲で比較した場合、20mMの酢酸緩衝液から20mMのクエン酸緩衝液系に変更することにより、同一のpHであっても低温沈殿が抑制されることが確認された。

[0033] [参考例1]ガングリオシドGM3に対する組換え型ヒト抗体の作製

1.1 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の構築

ガングリオシドGM3に結合するヒト抗体のH鎖をコードする遺伝子は、Epstein-Barrウイルスで形質転換されたヒトB細胞(以下、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞と表記する)より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。

Total RNAは、RNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN社製)を用いて $1 \times 10^7$ 細胞の抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出した。Hoonらが報告している抗ガングリオシドGM3ヒト抗体遺伝子の塩基配列(Cancer Research 1993;53:5244-5250)に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド(LMH-f3、LMH-r3)を設計した。LMH-f3(配列番号:7)はセンス方向で、LMH-r3(配列番号:8)はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。 $1 \mu\text{g}$ のTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLMH-r3を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLMH-f3を用いた。逆転写反応は42℃で1時間30分間反応させた。

PCR反応溶液(50  $\mu\text{L}$ )の組成を次に示す。

5  $\mu\text{L}$ の10×Advantage 2 PCR Buffer、

5  $\mu\text{L}$ の10×Universal Primer A Mix、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1  $\mu\text{L}$ のAdvantage 2 Polymerase Mix、

(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)

2.5  $\mu\text{L}$ の逆転写反応産物、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLMH-f3またはLMH-r3

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて30秒間、

94°C/5秒間、72°C/3分間のサイクルを5回

94°C/5秒間、70°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを5回反復

94°C/5秒間、68°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを25回反復

最後に反応産物を72°Cで7分間加熱した。

[0034] PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素ApaI (宝酒造社製)及びSacII (宝酒造社製)で消化して得られる約1.1kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素ApaI (宝酒造社製)及びNotI (宝酒造社製)で消化して得られる約1.1kbpの断片を混合し、pBluescript KS+ベクター (東洋紡社製)へクローニングし、完全長抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子を得た。

[0035] 動物細胞発現用ベクターへクローニングするために、合成オリゴヌクレオチドLMH-fxho、LMH-rsalを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LMH-fxho (配列番号:11)は前方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつXhoI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またLMH-rsal (配列番号:12)は後方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、SalI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

PCR反応溶液(50  $\mu$  L)の組成を次に示す。

5  $\mu$  Lの10×PCR Buffer、

1mM MgSO<sub>4</sub>、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)、

10ngの完全長抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖遺伝子を含むpBluescript KS+ベクター、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLMH-fxho、LMH-rsal

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて2分間、  
94℃/15秒間、60℃/30秒間、68℃/2分間のサイクルを30回反復  
最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

[0036] 増幅した遺伝子断片は、制限酵素XhoI(宝酒造社製)および制限酵素SalI(宝酒造社製)で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて精製し、pUCAGの制限酵素XhoI部位に連結し、クローニングした。本ベクターpUCAGは、pCXN(Niwaら、Gene 1991;108:193-200)を制限酵素BamHIで消化して得られる2.6kbpの断片をpUC19ベクター(東洋紡社製)の制限酵素BamHI部位に連結し、クローニングしたベクターである。完成したプラスミドをpUCAG/L612Hと命名した。本プラスミドに含まれる抗ガングリオシドGM3ヒト抗体H鎖の塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号:1及び配列番号:2に示す。

[0037] 1.2 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖遺伝子の構築

抗ガングリオシドGM3ヒト抗体のL鎖をコードする遺伝子は抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。Total RNAは、上記と同様にして抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出した。Hoonらが報告している抗ガングリオシドGM3ヒト抗体遺伝子の塩基配列(Cancer Research 1993;53:5244-5250)に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド(LML-f1、LML-r1)を設計した。LML-f1(配列番号:9)はセンス方向で、LML-r1(配列番号:10)はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。

1  $\mu$  gのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLML-r1を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドLML-f1を用いた。逆転写反応は42℃で1時間30分間反応させた。

PCR反応溶液(50  $\mu$  L)の組成を次に示す。

5  $\mu$  Lの10×Advantage 2 PCR Buffer、  
5  $\mu$  Lの10×Universal Primer A Mix、  
0.2mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1  $\mu$  LのAdvantage 2 Polymerase Mix

(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)

2.5  $\mu$  Lの逆転写反応産物、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLML-f1またはLML-r1

また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて30秒間、

94°C/5秒間、72°C/3分間のサイクルを5回反復

94°C/5秒間、70°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを5回反復、

94°C/5秒間、68°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを25回反復

最後に反応産物を72°Cで7分間加熱した。

[0038] PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製)で消化して得られる約0.7kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製)で消化して得られる約0.9kbpの断片を混合し、合成オリゴヌクレオチドLML-feco、LML-rnotを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。LML-feco (配列番号: 13)は前方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつEcoRI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またLML-rnot (配列番号: 14)は後方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、NotI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

PCR反応溶液(50  $\mu$  L)の組成を次に示す。

5  $\mu$  Lの10×PCR Buffer、

1mM MgSO<sub>4</sub>、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)

5'末端側遺伝子断片、

3'末端側遺伝子断片、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドLML-feco、LML-rnot

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて2分間

94℃/15秒間、60℃/30秒間、68℃/2分間のサイクルを30回反復

最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

[0039] 増幅した遺伝子断片は、制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素NotI(宝酒造社製)で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて精製し、pCXND3の制限酵素EcoRIおよびNotI切断部位に連結し、クローニングした。

本ベクターpCXND3の構築の流れについて、以下に述べる。DHFR-Δ E-rvH-PM1-f(WO92/19759参照)の抗体H鎖遺伝子とベクターを分割するために、制限酵素EcoRI/SmaI部位で消化し、ベクター側のみ回収した後に、EcoRI-NotI-BamHI adaptor(宝酒造社製)をクローニングした。このベクターをpCHOIと命名した。

pCHOIのDHFR遺伝子発現部位をpCXN(Niwaら、Gene 1991;108:193-200)の制限酵素HindIII部位にクローニングしたベクターをpCXND3と命名した。また、L鎖遺伝子断片をpCXND3にクローニングし、完成したプラスミドをpCXND3/L612Lと命名した。本プラスミドに含まれる抗ガングリオシドGM3ヒト抗体L鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号:3および配列番号:4に示す。

[0040] 1.3 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体の発現ベクターの構築

抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現ベクターを作製するために、pUCAG/L612Hを制限酵素HindIII(宝酒造社製)で消化して得られる約4.0kbpの断片をpCXND3/L612Lの制限酵素HindIII切断部位に連結し、クローニングした。完成したプラスミドをpCXND3/L612IgMと命名した。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体遺伝子を発現する。

[0041] 1.4 抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖遺伝子および発現ベクターの構築

抗ガングリオシドGM3ヒト抗体のJ鎖をコードする遺伝子は抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。

Total RNAは、上記と同様にして抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現B細胞より抽出した。GenBankに登録されているヒト抗体J鎖遺伝子の塩基配列(GenBank番号:M12759)に基づいて、2本のオリゴヌクレオチド(J-f1、J-r1)を設計し、合成した。J-f1(配列番号:15)はセンス方向でヒト抗体J鎖遺伝子Exon3にハイブリダイズし、J-r1(配列番号:16)はアンチセンス方向でヒト抗体J鎖遺伝子Exon4にハイブリダイズする。

1  $\mu$  gのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い5'末端側と3'末端側に分割して遺伝子断片を増幅した。5'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドJ-r1を用い、3'末端側遺伝子の増幅は合成オリゴヌクレオチドJ-f1を用いた。逆転写反応は42°Cで1時間30分間反応させた。

[0042] PCR反応溶液(50  $\mu$  L)の組成を次に示す。

5  $\mu$  Lの10×Advantage 2 PCR Buffer、

5  $\mu$  Lの10×Universal Primer A Mix、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1  $\mu$  LのAdvantage 2 Polymerase Mix

(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)

2.5  $\mu$  Lの逆転写反応産物、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドJ-f1またはJ-r1

また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて30秒間

94°C/5秒間、72°C/3分間のサイクルを5回反復

94°C/5秒間、70°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを5回反復

94°C/5秒間、68°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを25回反復

最後に反応産物を72°Cで7分間加熱した。

[0043] PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。

塩基配列決定の後、5'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI(宝酒造社



製)で消化して得られる約0.5kbpの断片、および3'末端側遺伝子を含むベクターを制限酵素EcoRI(宝酒造社製)で消化して得られる約1.0kbpの断片を混合し合成オリゴヌクレオチドJ-feco、J-rxbaを用いて完全長の遺伝子断片を増幅した。

J-feco(配列番号:17)は前方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、かつEcoRI制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、またJ-rxba(配列番号:18)は後方プライマーで抗ガングリオシドGM3ヒト抗体J鎖遺伝子の3'末端にハイブリダイズし、XbaI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

[0044] PCR反応溶液(50  $\mu$  L)の組成を次に示す。

5  $\mu$  Lの10 $\times$ PCR Buffer、

1mM MgSO<sub>4</sub>、

0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

1ユニットのDNAポリメラーゼKOD-Plus-

(以上の成分はいずれも東洋紡社製)

5'末端側遺伝子断片、

3'末端側遺伝子断片、

10pmoleの合成オリゴヌクレオチドJ-feco、J-rxba

また反応温度条件は次のとおりである。

94℃の初期温度にて2分間

94℃/15秒間、60℃/30秒間、68℃/2分間のサイクルを30回反復

最後に反応産物を72℃で5分間加熱した。

増幅した遺伝子断片は、制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素XbaI(宝酒造社製)で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて精製し、pCOSII-Zeoの制限酵素EcoRIおよびXbaI切断部位に連結し、クローニングした。

[0045] 本ベクターpCOSII-Zeoは、上述のpCHOIのDHFR遺伝子発現部位を除去し、Zeocin耐性遺伝子発現部位をクローニングしたベクターである。完成したプラスミドをpCOSII-Zeo/J chainと命名した。本プラスミドに含まれる抗ガングリオシドGM3ヒト抗体

J鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号:5および配列番号:6に示す。

[0046] 1.5 動物細胞を用いた抗ガングリオシドGM3ヒト抗体の発現

CHO細胞(DG44株)を用いた安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。Gene PulserII (BioRad社製)を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。J鎖を発現しない細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現ベクターpCXND3/L612IgM(25  $\mu$ g)とPBSに懸濁したCHO細胞( $1 \times 10^7$ 細胞/ml)の0.75mlを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25  $\mu$ FDの容量にてパルスを与えた。

[0047] 室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT supplement (Invitrogen社製)を1倍濃度で含むCHO-S-SFMII培地 (Invitrogen社製) 40mLに懸濁した。同様の培地で50倍希釈溶液を作製し、96ウェル培養用プレートに100  $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)で24時間培養後、Geneticin (Invitrogen社製)を0.5mg/mLになるように添加して2週間培養した。

Geneticin耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中のIgM量について参考例1.6に示す濃度定量法で測定した。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体高発現細胞株を順次拡大培養し、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体安定発現細胞株CA02、CA15、CA19、CA20、およびCA24を得た。

また、J鎖を発現する細胞株の遺伝子導入について以下に述べる。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体発現ベクターpCXND3/L612IgM(25  $\mu$ g)およびJ鎖発現ベクターpCOSII-Zeo/J chain(20  $\mu$ g)とPBSに懸濁したCHO細胞( $1 \times 10^7$ 細胞/ml)の0.75mlを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25  $\mu$ FDの容量にてパルスを与えた。

[0048] 室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT supplement (Invitrogen社製)を1倍濃度で含むCHO-S-SFMII培地 (Invitrogen社製) 40mLに懸濁した。

同様の培地で50倍希釈溶液を作製し、96ウェル培養用プレートに100  $\mu$ l/ウェルで分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)で24時間培養後、0.5mg/mL濃度のGeneticin (Invitrogen社製) および0.6mg/mL濃度のZeocin (Invitrogen社製)を添加し

て2週間培養した。Geneticin、Zeocin耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中のIgM量について参考例1.6に示す濃度定量法で測定した。抗ガングリオシドGM3ヒト抗体高発現細胞株を順次拡大培養し、抗ガングリオシドGM3ヒト抗体安定発現細胞株(CJ15、CJ25、CJ38、CJ45、CJ67)を得た。

[0049] 1.6 培養上清中のIgM濃度の測定

培養上清中のIgM濃度の測定は以下のように行った。Anti-Human IgM (BIOSORCE社製)を $1 \mu\text{g/ml}$ になるようにCoating Buffer ( $0.1\text{M NaHCO}_3$ 、 $0.02\%\text{NaN}_3$ )で希釈し、96ウェルELISA用プレートに $100 \mu\text{l}$ /ウェルで加え、 $4^\circ\text{C}$ で24時間以上反応させ、コーティングを行った。

さらに、Rinse Bufferで洗浄した後に、 $200 \mu\text{L}$ /ウェルのDiluent Bufferを加え、室温で1時間以上反応させ、ブロッキングした。Rinse BufferおよびDiluent Bufferの組成はそれぞれ次のとおりである。

[0050] Rinse Buffer:

PBS(-)、  
 $0.05\%$  Tween20

Diluent Buffer:

$50\text{mM}$  Tris、  
 $1\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、  
 $0.15\text{M}$  NaCl、  
 $0.05\%$  Tween20、  
 $0.02\%$   $\text{NaN}_3$ 、  
 $1\%$  BSA

[0051] その後、Diluent Bufferで適当に希釈した培養上清を $100 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。Rinse Bufferで洗浄した後に、Goat Anti-Human IgM、Alkaline Phosphatase conjugated (BIOSORCE社製)をDiluent Bufferで4000倍に希釈し、 $100 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。最後にRinse Bufferで洗浄した後にアルカリフォスファターゼ基質 (SIGMA社製)を加え、吸光光度計Benchmark Plus (BioRad社製)を用いて、測定波長 $405\text{nm}$ 、対照波長 $655\text{nm}$ の吸光度を測定した。IgM

濃度は抗ガングリオシドGM3ヒト抗体精製品 (Hoonら、Cancer Research 1993;53: 5244-5250)との比較で算出した。

各種抗ガングリオシドGM3ヒト抗体安定発現細胞株を75cm<sup>2</sup>培養フラスコ内で初発細胞密度 2x10<sup>5</sup> cells/mLで培養し、培養上清中のIgM濃度を上記の方法で測定した。結果を表2に示す。IgM産生量は培養3日目で約20mg/L、培養7日目で約50mg/Lであり、単一細胞が産生する能力を示す産生能は5〜19pg/cell/dayであった。IgMはイムノグロブリンの中でも多量体を形成するために、組換え体は発現量が低く、大量に調製することが困難であるとされていたが、今回の結果より、CHO細胞において高い産生量の組換え型IgM発現細胞が作製できることが明らかになった。

[0052] [表2]

J鎖発現	細胞株	培養3日間の産生量 (mg/L)	培養7日間の産生量 (mg/L)	産生能 (pg/cell/day)
無し	CA02	24.1	36.9	14.1
	CA15	11.8	39.7	4.9
	CA19	27.1	62.3	13.1
	CA20	20.2	35.4	10.5
	CA24	25.0	41.5	10.7
有り	CJ15	29.4	N. T.	19.4
	CJ25	24.4	N. T.	18.1
	CJ38	14.9	N. T.	12.4
	CJ45	26.4	N. T.	18.7
	CJ67	18.0	N. T.	12.8

N.T.: Not Tested

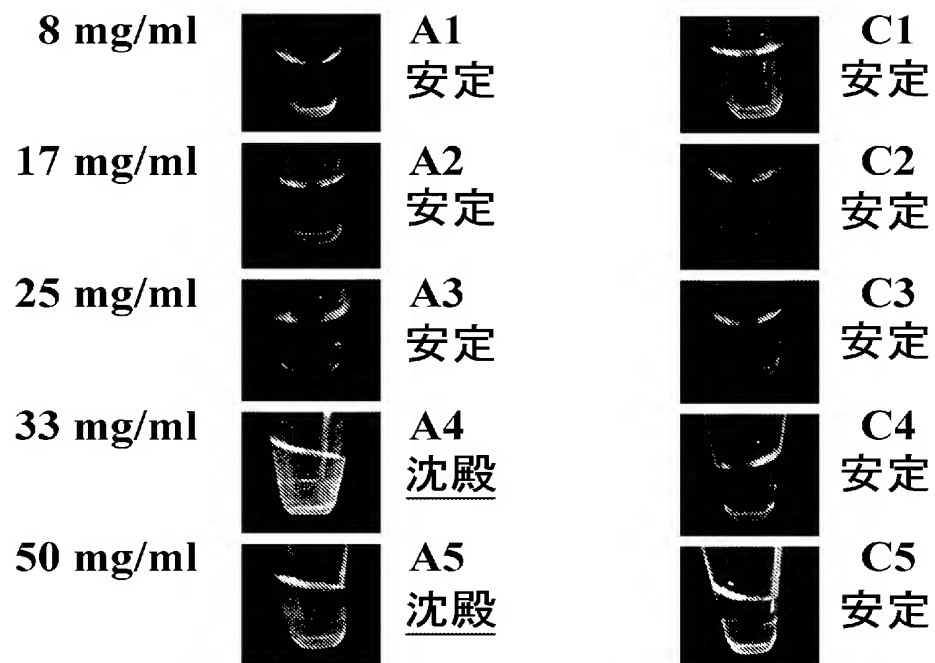
#### 産業上の利用可能性

[0053] 本発明により、低温下で高濃度のタンパク質を溶液中にて安定化することが可能となった。本発明によれば、IgMなどのタンパク質を有効成分とする医薬製剤を低温にて長期間安定に保存することが可能であるため、本発明は特にタンパク質製剤の調製に大きく貢献しうるものである。

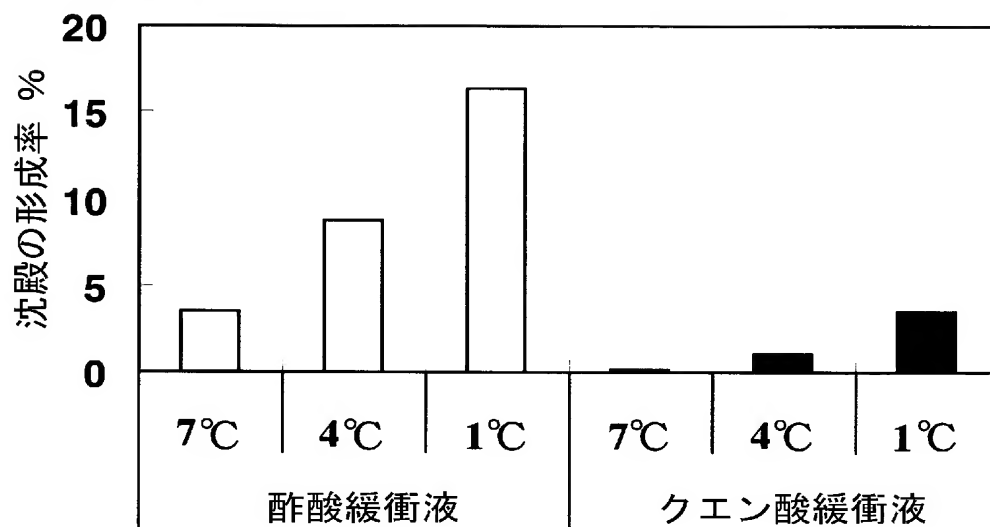
### 請求の範囲

- [1] タンパク質を低温で安定化する方法であって、タンパク質を含有する溶液にクエン酸緩衝液を添加する方法。
- [2] タンパク質の安定化が低温沈殿の抑制によるものである、請求項1に記載の方法。
- [3] タンパク質がIgMである、請求項1に記載の方法。
- [4] タンパク質を含有する溶液のpHが5〜8である、請求項1に記載の方法。

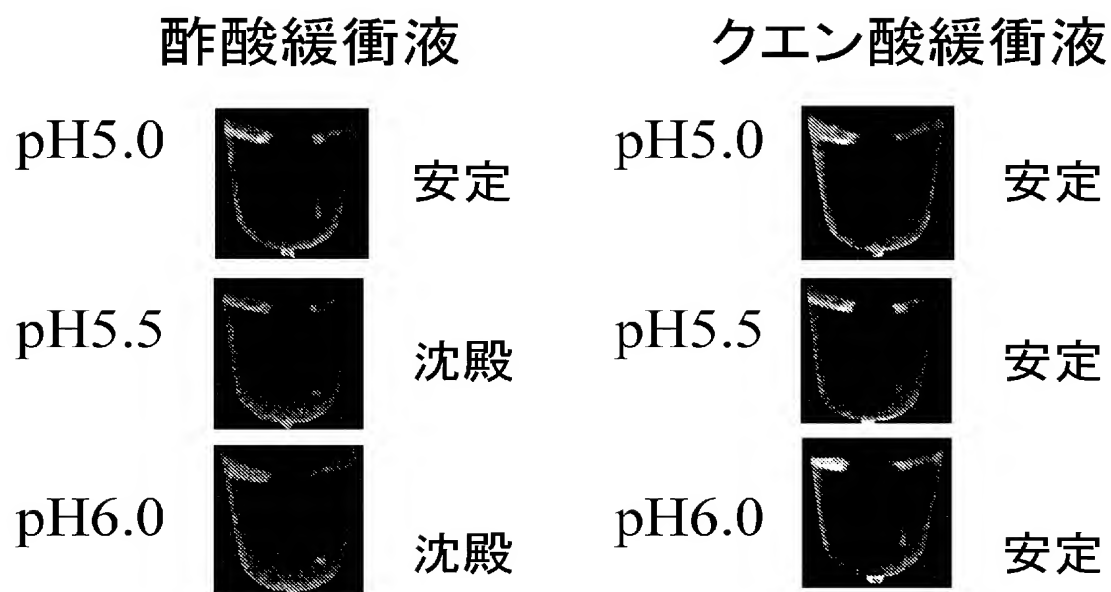
[図1]



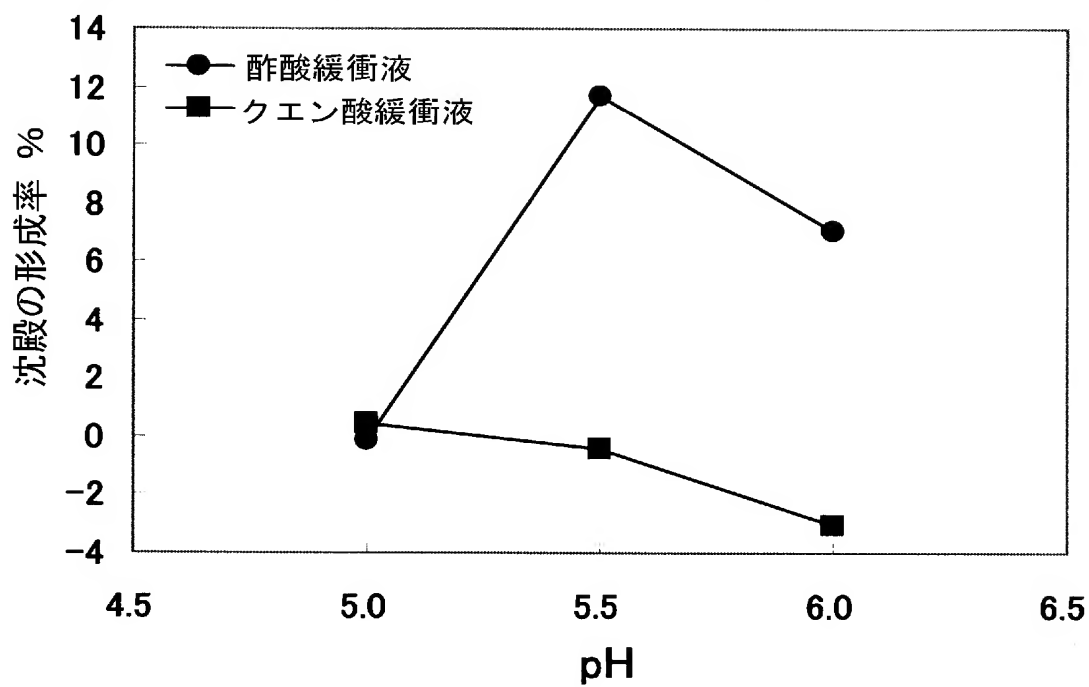
[図2]



[図3]



[図4]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014919

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/00, 1/02, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K1/00-16/46, C12N15/00-90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 07-502497 A (THE WELLCOME FOUNDATION LTD.), 16 March, 1995 (16.03.95), & WO 1993/008837 A1 & US 5792838 A	1-4
Y	WO 1999/037329 A1 (AKTIEBOLAG), 29 July, 1999 (29.07.99), & SE 9800170 A	1-4
Y	WO 2000/066160 A1 (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 09 November, 2000 (09.11.00), & EP 1174148 A1	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 November, 2004 (18.11.04)

Date of mailing of the international search report  
07 December, 2004 (07.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014919

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 06-189781 A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 12 July, 1994 (12.07.94), (Family: none)	1-4
A	B. CHEN, et al., Strategies To Suppress Aggregation of Recombinant Keratinocyte Growth Factor during Liquid Formulation Development, 1994, 83(12), p.1657-61	1-4

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/014919

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-4 (part)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See extra sheet.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/014919

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Claims 1-4

The degree of the "low temperature" in the above claims is indefinite, so that the claims are not clear.

The stabilization of proteins is ascertained in Examples only at 7°C, 4°C, and 1°C, so that whether the methods of the above claims are effective at temperatures higher than 7°C or lower than 1°C or not is unclear. Thus, the inventions of the above claims are inadequately supported and are not disclosed in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search has been made on the inventions which are inadequately supported by the description and are not clearly and completely disclosed in the description.

Claims 1, 2, 4

It is unclear what "proteins" can be stabilized by the addition of a citrate buffer in addition to "IgM" whose stabilization at low temperature is ascertained in Examples. Thus, the inventions of the above claims are inadequately supported by the description and are not disclosed in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search has been made on the inventions which are inadequately supported by the description and are not clearly and completely disclosed in the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C07K 16/00, 1/02, C12N 15/09		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C07K 1/00-16/46, C12N 15/00-90		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JICSTファイル (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 07-502497 A (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 1995. 03. 16 & WO 1993/008837 A1 & US 5792838 A	1-4
Y	WO 1999/037329 A1 (AKTIEBOLAG) 1999. 07. 29 & SE 9800170 A	1-4
Y	WO 2000/066160 A1 (山之内製薬株式会社) 2000. 11. 09 & EP 1174148 A1	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せにより進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 18. 11. 2004	国際調査報告の発送日 07.12.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 阪野 誠司	4 N 9 2 8 6
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 06-189781 A (三井東圧化学株式会社) 1994.07.12 (ファミリーなし)	1-4
A	B. CHEN, et. al, Strategies To Suppress Aggregation of Recombinant Keratinocyte Growth Factor during Liquid Formulation Development, 1994, 83 (12), p.1657-61	1-4

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-4の一部 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
特別ページ参照。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 請求の範囲 1 - 4

上記請求の範囲において、「低温」とはどの程度か不明である。したがって、該請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

また、実施例でタンパク質が安定化することが実際に確認されているのは、7℃、4℃、1℃の温度であり、7℃より高い温度及び1℃より低い温度で上記請求の範囲に係る方法が有効であるか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、上記の如く、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

## 請求の範囲 1、2、4

上記請求の範囲に係る「タンパク質」として、実施例等で低温で安定化することが示されている「IgM」以外に、どのようなものがクエン酸緩衝液を添加することにより安定化できるか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、上記の如く、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。